

REC'D 15 AUG 2003

WIPO

PCT

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

#2  
PCT/JP03/08367

01.07.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年 7月 2日  
Date of Application:

出願番号 特願2002-193814  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP2002-193814]

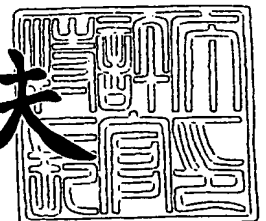
出願人 山之内製薬株式会社  
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月31日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3060996

【書類名】 特許願

【整理番号】 0000003159

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/00

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内

    【氏名】 荻野 淳

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内

    【氏名】 遠藤 英樹

【特許出願人】

    【識別番号】 000006677

    【氏名又は名称】 山之内製薬株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100089200

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 長井 省三

【選任した代理人】

    【識別番号】 100109357

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 矢野 恵美子

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 005348

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 インスリン抵抗性改善薬スクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 i) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもPPAR $\gamma$ と相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ii) 配列番号4で表されるPPAR $\gamma$ 蛋白質の少なくともAF-1領域と転写因子のDNA結合領域とからなる融合蛋白質をコードするポリヌクレオチド、及び、iii) 前記転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞、あるいは、

i) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもPPAR $\gamma$ と相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及びii) 配列番号4で表されるPPAR $\gamma$ 蛋白質が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換され、

a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもPPAR $\gamma$ と相互作用するポリペプチド、及び、b) 配列番号4で表されるPPAR $\gamma$ 蛋白質を発現している細胞。

【請求項2】 転写因子が酵母のGAL4蛋白質である請求項1記載の細胞。

【請求項3】 レポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である請求項1記載の細胞。

【請求項4】 i) 請求項1乃至請求項3に記載の細胞に被検物質を接触させる工程、及び、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として被検物質依存的な相互作用の変化または被検物質依存的なPPAR $\gamma$ の転写誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、被検物質がPPAR $\gamma$ の転写誘導活性を促進するか否かを検出する方法。

【請求項5】 i) 請求項1乃至請求項3に記載の細胞に被検物質を接触させる工程、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として被検物質依存的な相互作用

用の変化または被検物質依存的なPPAR $\gamma$ の転写誘導活性の変化を分析する工程、及びi i i) レポーター活性を亢進する被検物質を選択する工程を含むことを特徴とする、PPAR $\gamma$ の転写誘導活性を促進する物質をスクリーニングする方法。

【請求項6】 PPAR $\gamma$ の転写誘導活性を促進する物質がインスリン抵抗性改善薬である請求項5記載のスクリーニング方法。

【請求項7】 i) PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースを発現している細胞に被検物質を接触させる工程、及び、i i) 被検物質依存的なPPAR相互作用p68 RNA ヘリケース発現量の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法。

【請求項8】 i) 配列番号5で表される塩基配列からなるp68 RNA ヘリケースのプロモーター領域と融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞に被検物質を接触させる工程、及び、i i) レポーター遺伝子の発現を指標として被検物質依存的な転写誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、PPAR $\gamma$ の転写誘導活性を促進する物質、及び／又はインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法に関する。

##### 【0002】

#### 【従来の技術】

インスリン抵抗性改善薬としてすでに効果が認められているチアゾリジン誘導体はペルオキシソーム増殖剤応答性受容体ガンマ (peroxisome proliferator activated receptor gamma: PPAR $\gamma$ ) のアゴニストとして作用することが示されている (Lehmannら、J.Biol.Chem.、第270巻、第12953-12956頁、1995年)。PPAR $\gamma$ は核内受容体スーパーファミリーに属し、リガンドの結合によって活性化される転写促進因子として標的遺伝子上流にある応答配列に結合し、その転写を誘導することが知られている (Mangelsdorfら、Cell、第83巻、第835-839頁、1995年)。

）。PPAR $\gamma$  アゴニストは細胞の増殖を停止し、細胞分化を促進することが報告されている (Kitamuraら、Jpn. J. Cancer Res.、第90巻、第75項、1999年)。PPAR $\gamma$  は特に脂肪組織で発現が認められ (Tontonozら、Genes and Development、第8巻、第1224-1234頁、1994年、Tontonozら、Cell、第79巻、第1147-1156頁、1994年)、ホモ欠損型マウスでは脂肪細胞の分化誘導が起こらない。またPPAR $\gamma$  のアゴニストとして作用するチアゾリジン誘導体の投与は大型脂肪細胞の減少と小型脂肪細胞の増加を引き起こす (Kubotaら、Mol. Cell、第4巻、第597-609頁、1999年)。以上の知見から、チアゾリジン誘導体がインスリン抵抗性を改善する機構はPPAR $\gamma$  アゴニストが急速に脂肪細胞の分化を促進する結果、インスリン抵抗性誘発原因物質であるTNF $\alpha$  の産生抑制、末梢組織でのグルコーストランスポーター発現の促進、遊離脂肪酸産生の抑制が起こり、結果、細胞内への糖取り込みが亢進して高血糖が改善され则认为られている。(Lehmannら、J. Biol. Chem.、第270巻、第12953-12956頁、1995年)。チアゾリジン誘導体のPPAR $\gamma$  との親和性は生体内の血糖降下作用と相関することから、該化合物群のインスリン抵抗性改善作用はPPAR $\gamma$  の活性化を介した作用であると考えられている (Willsonら、J. Med. Chem.、第39巻、第665-668頁、1996年)。このようなことからPPAR $\gamma$  の転写誘導活性を促進することはインスリン抵抗性を改善すると考えられ、そのため、PPAR $\gamma$  のアゴニストの検出方法はインスリン抵抗性糖尿病治療薬をスクリーニングする有効な手法であると考えられてきた。

しかしながら近年チアゾリジン誘導体を用いた臨床での知見から、PPAR $\gamma$  のアゴニスト作用を持つ従来の合成リガンドは、インスリン抵抗性改善作用のみでなくいずれも肝臓機能障害を引き起こし、また生体内の循環血漿量を増大させて浮腫を惹起することが報告された (SchoonjansおよびAuwerx、The Lancet、第355巻、第1008-1010頁、2000年；金澤ら、Diabetes Frontier、第10巻、第811-818頁、1999年；岩本、Diabetes Frontier、第10巻、第819-824頁、1999年)。このPPAR $\gamma$  の合成アゴニストによる肝臓機能障害は重篤な副作用であり、浮腫の惹起も心肥大等をもたらす重篤な副作用であることからインスリン抵抗性改善という主作用との乖離が強く望まれている。しかし、これまでにチアゾリジン誘導体がこのような副作用をもたらす分子メカニズムは解明されていない。一般に核内受容

体はその構造中に二カ所の転写促進領域を持っており、N末端側のものはAF-1領域、C末端側のものはAF-2領域と呼ばれている。AF-2領域はリガンドに依存した転写促進に関与しているとされることから (Mangelsdorfら、Cell、第83巻、第841-850頁、1995年)、これまでに多くの研究がなされ、アゴニストの探索等にも利用されてきた。一方、AF-1領域に関してはリガンドに非依存的な転写促進に関与しているという他に多くの知見はない。ところが近年、PPAR $\gamma$ のAF-1領域に点変異を持つヒトのなかに特徴的な表現型を示すものの存在が報告され、特に第12番目のプロリンがアラニンに変異しているヒトは、野生型に比べて肥満に抵抗性であり良好なインスリン感受性を示すことが報告された (Deebら、Nature Genetics、第20巻、第284-287頁、1998年)。

PPAR $\gamma$ の転写誘導活性には他の核内受容体同様に転写共役因子群との相互作用が必要であり、PPAR $\gamma$ と相互作用する因子を同定しようとする試みがなされて来た。実際に、既存の核内受容体相互作用因子とPPAR $\gamma$ との結合が調べられており、SRC-1 (Zhuら Gene Expr. 第6巻、第185-195頁、1996年)、CBP/p300 (Gelmanら、J.Biol.Chem.、第274巻、第7681-7688頁、1999年) など複数の分子がPPAR $\gamma$ と相互作用することが報告されている。しかしながら、これらの共役因子群は主にAF-2領域に結合するものと考えられており、AF-1領域に結合する共役因子として知られているものは現在のところわずかにPGC-2 (Castilloら、EMBO J. 第18巻、第3676-3687頁 1999年) が挙げられるに留まっている。

p68 RNA ヘリケースはその生理的役割があまり知られていなかったが、核内受容体の一つであるエストロゲンレセプター $\alpha$ のAF-1領域に結合する転写誘導共役因子であることが明らかになった (Endohら、Mol.Cell.Biol.、第19巻、第5363-5372頁、1999年)。さらに近年、p68 RNA ヘリケースが脂肪細胞分化に関与していることが明らかにされてきた (Kitamuraら、Biochem.Biophys.Res.Comm., 第287巻: 435-439頁、2001年) (Oishiら、Animal Genetics, 第31巻: 166-170頁、2000年)。しかし、その詳細な分子メカニズムについては依然不明である。

### 【0003】

#### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、PPAR $\gamma$ の転写誘導活性を促進することによる従来のPPARアゴ

ニストとは異なる新しいタイプのインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング方法を提供することにある。

#### 【0004】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、PPAR $\gamma$  のAF-1領域に結合する蛋白質として、p68 RNA ヘリケースを同定した。さらに、ヒト脂肪組織中でp68 RNA ヘリケースが発現していることを見出した。次いで、p68 RNA ヘリケースが過剰に発現するとPPAR $\gamma$  の転写誘導活性が促進することを見出した。また、インスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾンがp68 RNA ヘリケースの発現を誘導することを見出し、該蛋白質の発現亢進が糖尿病態改善となることを見出した。

これらの知見をもとにして、PPAR $\gamma$  とp68 RNA ヘリケースとの相互作用を促進する、および／または、p68 RNA ヘリケースの発現を亢進することによりPPAR $\gamma$  の転写誘導活性を促進するインスリン抵抗性を改善する新しい化合物の同定およびスクリーニング方法を完成した。

#### 【0005】

すなわち本発明は、

[1] i) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもPPAR $\gamma$  と相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ii) 配列番号4で表されるPPAR $\gamma$  蛋白質の少なくともAF-1領域と転写因子のDNA結合領域とからなる融合蛋白質をコードするポリヌクレオチド、及び、iii) 前記転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞、

あるいは、

i) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもPPAR $\gamma$  と相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及びii) 配列番号4で表されるPPAR $\gamma$  蛋白質が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換され、

a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質において、1~10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも PPAR $\gamma$  と相互作用するポリペプチド、及び、b) 配列番号 4 で表される PPAR $\gamma$  蛋白質を発現している細胞、

[2] 転写因子が酵母の GAL4 蛋白質である請求項 1 記載の細胞、

[3] レポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である請求項 1 記載の細胞、

[4] i) 請求項 1 乃至請求項 3 に記載の細胞に被検物質を接触させる工程、及び、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として被検物質依存的な相互作用の変化または被検物質依存的な PPAR $\gamma$  の転写誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、被検物質が PPAR $\gamma$  の転写誘導活性を促進するか否かを検出する方法、

[5] i) 請求項 1 乃至請求項 3 に記載の細胞に被検物質を接触させる工程、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として被検物質依存的な相互作用の変化または被検物質依存的な PPAR $\gamma$  の転写誘導活性の変化を分析する工程、及び iii) レポーター活性を亢進する被検物質を選択する工程を含むことを特徴とする、PPAR $\gamma$  の転写誘導活性を促進する物質をスクリーニングする方法、

[6] PPAR $\gamma$  の転写誘導活性を促進する物質がインスリン抵抗性改善薬である請求項 5 記載のスクリーニング方法、

[7] i) PPAR 相互作用 p68 RNA ヘリケースを発現している細胞に被検物質を接触させる工程、及び、ii) 被検物質依存的な PPAR 相互作用 p68 RNA ヘリケース発現量の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法、

[8] i) 配列番号 5 で表される塩基配列からなる p68 RNA ヘリケースのプロモーター領域と融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞に被検物質を接触させる工程、及び、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として被検物質依存的な転写誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法

に関する。

【0006】



## 【発明の実施の形態】

以下に本発明を詳細に説明する。

## &lt;&lt;本発明の細胞&gt;&gt;

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、公知のヒト由来の天然型p68 RNA ヘリケースである。配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、公知のヒト由来の天然型PPAR $\gamma$ である。

PPAR $\gamma$  転写活性試験のための本発明の細胞作成用の、PPAR $\gamma$  と相互作用するポリペプチドには、

- (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；
  - (2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもPPAR $\gamma$  のAF-1領域と相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（以下、機能的等価改変体と称する）；
  - (3) 配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、PPAR $\gamma$  のAF-1領域と相互作用する蛋白質であるポリペプチド（以下、相同ポリペプチドと称する）；
- が含まれる。

機能的等価改変体としては、「配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかもPPAR $\gamma$  のAF-1領域と相互作用する蛋白質であるポリペプチド」、「配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～10個、好ましくは1～7個、更に好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、PPAR $\gamma$  のAF-1領域と相互作用する蛋白質であるポリペプチド」が含まれる。

相同ポリペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、PPAR $\gamma$  のAF-1領域と相互作用する蛋白質である限り、特に限定されるものではないが、配列番号2で表されるアミノ酸配列に関して、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなることができ、好ましくはPPAR $\gamma$  のAF-1領域と相互作用する蛋白質である。なお、本明細書における前記「相同性」と

は、Clustal program (HigginsとSharp、Gene、第73巻、第237-244頁、1998年；Thompsonら、Nucleic Acid Res.、第22巻、第4673-4680頁、1994年) 検索によりデフォルトで用意されているパラメータを用いて得られた値を意味する。前記のパラメータは以下のとおりである。

Pairwise Aliment Parametersとして

K tuple 1

Gap Penalty 3

Window 5

Diagonals Saved 5

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、機能的等価改変体、相同ポリペプチドを総称して「PPAR相互作用p68RNA ヘリケース」と称する。

PPAR $\gamma$  転写誘導試験のための本発明の細胞作成用の、PPAR $\gamma$  蛋白質融合体をコードする遺伝子は、配列番号4で表されるPPAR $\gamma$  蛋白質の少なくともAF-1領域と転写因子のDNA結合領域とからなる融合蛋白質をコードする遺伝子であればよい。PPAR $\gamma$  のAF-1領域は配列番号3で表される塩基配列の第1番目～第504番目の塩基配列により表される領域である。また、上記DNA結合領域は、いずれの転写因子のDNA結合領域を用いてもよい。「DNA結合領域」は、DNAに結合するために機能する領域であり、応答配列に対するDNA結合能を有するが、単独で転写誘導能を有しないものを示す。

#### 【0007】

上記の実施態様において、PPAR $\gamma$  の転写誘導能を検出するために用いられる「転写因子」は、細胞核内で特定のDNA配列に結合する領域を有する真核生物の転写因子であれば限定されない。また転写因子のDNA結合領域は、応答配列に対するDNA結合能は有するが、単独で転写誘導能を有しないものであればよい。このような転写因子としては、例えば、酵母のGAL4蛋白質 (Keeganら、Science、第231巻、第699-704頁、1986年、Maら、Cell、第48巻、第847-853頁、1987年) が挙げられる。GAL4転写因子のDNA結合領域および転写誘導領域は、例えばGAL4の場合、N末端側（およそ第1番目から147番目までのアミノ酸を含む領域）に存在する。

「応答配列」は、転写因子のDNA結合領域が結合し得るDNA配列を用いる。遺伝子

の上流域からその領域を切り出して用いる、あるいはその配列を化学的に合成して用いてもよい。「応答配列」のより詳しい定義と実例については「分子細胞生物学第4版」(丸山ら訳、東京化学同人社、2001年)に記載されている。

応答配列の下流に配置される「レポーター遺伝子」は、一般に用いられるものであれば特に限定されないが、定量的測定が容易な酵素遺伝子などが好ましい。例えば、バクテリアトランスポゾン由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(CAT)、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子(Luc)、クラゲ由来の緑色蛍光蛋白質遺伝子(GFP)等があげられる。レポーター遺伝子は、応答配列の下流に機能的に連結される、あるいはプロモーターに応答配列を挿入されているものが用いられる。

#### 【0008】

PPAR $\gamma$ 、転写因子のDNA結合領域、PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースをコードするポリヌクレオチドは、既知のアミノ酸配列や塩基配列の情報などをもとに設計し合成したプライマーやプローブを用いて、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法やハイブリダイゼーションによるスクリーニングにより、cDNAライブラリーから単離できる。PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースは、同じ分子種として同定されるもので、PPAR $\gamma$ に相互作用して該受容体のリガンド存在下での転写誘導能に影響を与えるものであればいずれの種由来のものであってもよく、例えばヒト (GenBank accession 番号X15729、X52104およびAF015812)、マウス (GenBank accession 番号X65627)、ヤマネコ (GenBank accession 番号AF110009) などの哺乳動物由来のものが挙げられる。PPAR $\gamma$ は、同じ分子種として同定されるもので、核内受容体としての生体内での機能を果たすものであればいずれの種由来のものであってもよく、例えばヒト (GenBank accession 番号 U79012)、マウス (GenBank accession 番号 U09138)、ラット (GenBank accession 番号 AB019561) などの哺乳動物由来のものなどが挙げられる。また、PPAR $\gamma$ には、PPAR $\gamma$ 1及びPPAR $\gamma$ 2の二種のアイソフォームが存在し、PPAR $\gamma$ 1はPPAR $\gamma$ 2と比較するとN末端側の30アミノ酸が欠失しているが、その他のアミノ酸配列は全く同じであり、いずれも脂肪組織に発現していることが知られている。

#### 【0009】

PPAR $\gamma$ 、転写因子のDNA結合領域、またはPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースをコードするポリヌクレオチドは、例えば次のように得ることができるが、この方法に限らず公知の操作「Molecular Cloning」[Sambrook, Jら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年]でも得ることができる。

例えば、(1) PCRを用いた方法、(2) 常法の遺伝子工学的手法（すなわちcDNAライブラリーで形質転換した形質転換株から所望のアミノ酸を含む形質転換株を選択する方法）を用いる方法、又は(3) 化学合成法などを挙げることができる。各製造方法については、WO01/34785に記載されていると同様に実施できる。

PCRを用いた方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1) 蛋白質遺伝子の製造方法a) 第1製造法に記載された手順により、本明細書記載のポリヌクレオチドを製造することができる。該記載において、「本発明の蛋白質を産生する能力を有するヒト細胞あるいは組織」とは、例えば、ヒト脂肪組織を挙げることができる。ヒト脂肪組織からmRNAを抽出する。次いで、このmRNAをランダムプライマーまたはオリゴdTプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い、第一鎖cDNAを合成することが出来る。得られた第一鎖cDNAを用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ2種類のプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に供し、本発明のポリヌクレオチドまたはその一部を得ることができる。より具体的には、例えば実施例1に記載の方法により本発明のポリヌクレオチドを製造することが出来る。

常法の遺伝子工学的手法を用いる方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1) 蛋白質遺伝子の製造方法b) 第2製造法に記載された手順により、本明細書のPPAR $\gamma$ 、転写因子のDNA結合領域、またはPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースをコードするポリヌクレオチドを製造することができる。

化学合成法を用いた方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1) 蛋白質遺伝子の製造方法c) 第3製造法、d) 第4製造法に記載された方法によって、本明細書のPPAR $\gamma$ 、転写因子のDNA結合領域、またはPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースをコードするポリヌクレオチドを製造することができる。

【0010】

「Molecular Cloning」[Sambrook, Jら、Cold Spring Harbor Laboratory Press

、1989年]に記載の方法により、これら各領域をコードするDNAを単独、あるいは連結し、適当なプロモーターの下流に連結することでPPAR $\gamma$ 及びPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの試験細胞内での発現系が構築できる。具体的には上述のように得られたポリヌクレオチドは、適当なベクタープラスミドに組み込み、プラスミドの形で宿主細胞に導入すればよい。これらは、両者が一つのプラスミド上に含まれるよう構成してもよく、あるいは各々別々のプラスミド上に含まれるよう構成してもよい。あるいは、このような構成が染色体DNAに組み込まれた細胞を取得してこれを用いてもよい。

応答配列に連結されたレポーター遺伝子も、一般的な遺伝子組換え技術を用いて構築し、この構成をベクタープラスミド中に組込んだ上、得られた組換えプラスミドを宿主細胞中に導入したものを用いる。あるいは、このような構成が染色体DNAに組み込まれた細胞を取得してこれを用いてもよい。

PPAR $\gamma$ は外部から導入しても良いが、内在性のPPAR $\gamma$ が豊富に存在する細胞、例えば脂肪由来細胞などを宿主細胞として用いる場合は、上述の構成のうち、PPAR $\gamma$ を省いて、応答配列に連結されたレポーターとPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースからなる構成のみを導入してもよい。

より具体的には、単離されたポリヌクレオチドを含む断片は、適当なベクタープラスミドに再び組込むことにより、真核生物及び原核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。宿主細胞を形質転換し、遺伝子を発現させる方法は、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」2)本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の組換え蛋白の製造方法に記載された方法により実施できる。発現ベクターは、所望のポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、所望のポリヌクレオチドを挿入することにより得られる発現ベクターを挙げることができる。

本発明の細胞は、例えば、前記発現ベクターにより、所望の宿主細胞をトランスフェクションすることにより得ることができる。より具体的には、例えば、実施

例 2 に記載のように所望のポリヌクレオチドを哺乳動物細胞用の発現ベクター pcDNA3.1 に組み込むことにより、所望の蛋白質の発現ベクターを得ることができ、該発現ベクターを市販のトランスフェクション試薬リポフェクトアミン 2000 を用いて COS-1 細胞に取り込ませて本発明の形質転換細胞を製造することができる。

上記で得られる所望の形質転換細胞は、常法に従い培養することができ、該培養により所望の蛋白質が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記 COS-1 細胞であれば牛胎児血清 (FBS) 等の血清成分を添加したダルベッコ修飾イーグル最小必須培地 (DMEM) 等の培地に G418 を加えたものを使用できる。

#### 【0011】

##### <<本発明の検出及びスクリーニング法>>

本発明の、PPAR $\gamma$  と PPAR 相互作用 p68 RNA ヘリケースとの相互作用を促進する、あるいは、PPAR 相互作用 p68 RNA ヘリケースの発現を亢進することにより PPAR $\gamma$  の転写誘導活性を促進するインスリン抵抗性を改善する新しい化合物の同定およびスクリーニング方法を以下に記載する。

本発明の細胞（以下、試験用細胞と称する）を被験物質の存在下で培養し、PPAR $\gamma$  の転写誘導能に対する PPAR 相互作用 p68 RNA ヘリケースの促進作用が被験物質により促進されることをレポーター遺伝子の発現により検出し測定することができる。

また、例えば被験物質が PPAR 相互作用 p68 RNA ヘリケースの発現を促進したり分解を抑制するとき、発現するレポーター活性の増大が観察される。このような物質は PPAR $\gamma$  転写誘導活性促進剤として同定される。

これらはいずれも従来の PPAR アゴニストとは異なる構造を有し、より強い主作用を持ち副作用と乖離したインスリン抵抗性改善薬として作用することが期待される。

#### 【0012】

<PPAR $\gamma$  の転写誘導活性を促進する物質並びにインスリン抵抗性を改善する物質を検出及び／又はスクリーニングする方法>

本発明の一つの実施態様としては、[1] i) PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースをコードするポリヌクレオチド、ii) PPAR $\gamma$  蛋白質の少なくともAF-1領域と転写因子のDNA結合領域とからなる融合蛋白質をコードするポリヌクレオチド、及び、iii) 前記転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞、あるいは、

[2] i) PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースをコードするポリヌクレオチド、及び ii) PPAR $\gamma$  蛋白質が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換され、

a) PPAR相互作用p68 RNA ヘリケース、及び、b) PPAR $\gamma$  蛋白質を発現している細胞（試験用細胞）を用い、これに被験物質を接触させ、レポーター遺伝子の発現を指標として、試験用細胞における被験物質によるPPAR $\gamma$  の転写活性化能促進作用の変化を検出し、測定することからなるPPAR $\gamma$  の転写誘導活性を促進する物質及びインスリン抵抗性を改善する物質を選択、スクリーニングする方法が挙げられる。

ワンハイブリッドシステムは、レポーター遺伝子の発現をマーカーとして蛋白質間相互作用を検出する方法である。一般に転写因子はDNA結合領域と転写活性化領域という機能の異なる2つの領域を有するが、ワンハイブリッドシステムでは、2種類の蛋白質XとYの相互作用を調べるために、1) 転写因子のDNA結合領域とXからなる融合蛋白質と、2) Yの2種類を同時に培養細胞内で発現させる。蛋白質XとYが相互作用するとこれらが1つの転写複合体を形成し、これが細胞の核内において前記転写因子の応答配列（特異的に結合するDNAの部位）と結合してその下流に配置されたレポーター遺伝子の転写を活性化する。このように2つの蛋白質の相互作用をレポーター遺伝子の発現に置き換えて検出することができる。より具体的にはCastilloらの方法で実施することが出来る（EMBO J. 第18巻、第3676-3687頁 1999年）。したがって、PPAR $\gamma$  とPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの相互作用に対する被験物質の作用はレポーター遺伝子の発現に置き換えて検出することができ、PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースとPPAR $\gamma$  との相互作用を促進する物質（即ちPPAR $\gamma$  の転写誘導活性を促進する物質）並びにイ

ンスリン抵抗性を改善する物質の検出及び／又はスクリーニングを実施できる。PPAR $\gamma$ の転写誘導活性を促進する物質並びにインスリン抵抗性を改善する物質を検出及び／又はスクリーニングする方法において用いる細胞に発現するPPAR $\gamma$ が、PPAR $\gamma$ 全長蛋白質である場合には、好ましくは、アッセイ系にPPAR $\gamma$ リガンドを添加するとよい。核内受容体は一般にAF-2領域にリガンドが結合して立体構造が変化した結果、AF-1領域およびAF-2領域に転写共役因子がリクルートされてきて転写の活性化がおこることが報告されているからである。より具体的には、実施例2に記載の方法で前記スクリーニングを実施できる。

PPAR $\gamma$ 全長領域を用いる際に好ましい添加するPPAR $\gamma$ リガンドとしては、PPAR $\gamma$ の転写誘導能を惹起することができるものであればいずれのものであってもよく、例えば1~1000 nM、好ましくは1~100 nM、より好ましくは1~30 nMの最終濃度でPPAR $\gamma$ の転写誘導能を惹起することができるものが挙げられる。PPAR $\gamma$ リガンドとしては、例えば、ピオグリタゾンなどのチアゾリジン誘導体 (Lehmannら、J.Biol.Chem.、第270巻、第12953-12956項、1995年) が挙げられる。

PPAR $\gamma$ とPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの相互作用に対する被験物質の作用を測定することの特徴とする方法の別の実施態様としては、例えば、生化学的に検出する方法がある。このような方法では、例えばR Iなどで標識したPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースとグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、プロテインA、竈-ガラクトシダーゼ、マルトースーバインディングプロテイン (MBP) など適当なタグ蛋白質とPPAR $\gamma$ のAF-1領域からなる融合タンパク質との結合を被験物質の存在下で直接的に検出することで実施できる。より具体的には実施例1に記載の手法により実施できる。

また、別の実施態様としては免疫化学的な方法 (ELISA法) がある。このような方法では、例えば、2種類の蛋白質XとYの相互作用を調べるために、Xをあらかじめ固定しておき、これにYと被験物質を混ぜた後非特異的な結合を除くために適当な方法で洗浄し、さらにYと特異的に抗原抗体反応をする抗体を添加する。固定されたXに結合したYの量は、Yに特異的に反応した抗体量と置き換えて検出することができる。これを利用することで、PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースとPPAR $\gamma$ との相互作用を促進する物質並びにインスリン抵抗性を改善する物質



の検出及び／又はスクリーニングを実施できる。

PPAR $\gamma$  の転写誘導活性を促進する物質並びにインスリン抵抗性を改善する物質を検出及び／又はスクリーニングする方法としては、上記記載の方法が挙げられるが、上記態様において用いるPPARは、1) AF-1領域、2) 好ましくはリガンド添加と共にPPAR全長領域のいずれでもよい。

### 【0013】

<PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの発現量の変化を分析する工程を含むインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法>

i) PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースを発現している細胞に被検物質を接触させる工程、及び、ii) 被検物質依存的なPPAR相互作用p68 RNA ヘリケース発現量の変化を分析する工程を含むことを特徴とする方法で、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングすることが出来る。

「細胞」としては、PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースを発現している細胞ならば何れの細胞でもよく、PPAR相互作用p68 RNA ヘリケース発現ベクターを上記のように形質転換して得られた細胞でも良い。好ましくは実施例4に記載の培養細胞3T3L1が挙げられる。「PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースを発現している細胞」がp68 RNA ヘリケースを発現しているか否かは、p68 RNA ヘリケースをコードする塩基配列を有する遺伝子あるいはその一部を用いたノーザンブロッティング法、p68 RNA ヘリケースに特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティング法などにより特定することができる。PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースを発現している細胞に被検物質を添加又は非添加して一定時間培養させた後細胞を回収する。被検物質依存的なPPAR相互作用p68 RNA ヘリケース発現量の変化は、遺伝子の転写産物であるmRNA、又は、該mRNAによりコードされる蛋白質の量の変化として測定することができ、被検物質非添加の場合と被検物質添加の場合の前記発現量の変化を比較することにより、被検物質依存的なPPAR相互作用p68 RNA ヘリケース発現量の変化を分析することが出来る。前記の回収した細胞からRNAまたは細胞抽出液を得ることが出来る。回収したRNA中のPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースのmRNA量は、例えば、リアルタイムPCR法などにより検出する事が出来る。より具体的には、実施例4に記載の方法により、前記スクリーニングを実施できる。また

、回収した細胞抽出液中のPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの蛋白質量は、例えば、免疫化学的な方法（ウエスタンブロッティング法など）により検出することが出来る。このようにして、PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの発現量の変化を分析することによりインスリン抵抗性改善薬のスクリーニングを実施できる。

＜PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースプロモーターを利用しインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法＞

i) 配列番号5で表される塩基配列からなるp68 RNA ヘリケースのプロモーター領域と融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞に被検物質を接触させる工程、及び、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として被検物質依存的な転写誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴として、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングすることができる。

レポーター遺伝子アッセイ（田村ら、転写因子研究法、羊土社、1993年）は、レポーター遺伝子の発現をマーカーとして遺伝子の発現調節を検出する方法である。一般に遺伝子の発現調節はその5'上流域に存在するプロモーター領域と呼ばれる部分で制御されており、転写段階での遺伝子発現量はこのプロモーターの活性を測定することで推測することができる。被験物質がプロモーターを活性化すれば、プロモーター領域の下流に配置されたレポーター遺伝子の転写を活性化する。このようにプロモーター活性化作用すなわち発現亢進作用をレポーター遺伝子の発現に置き換えて検出することができる。したがって、PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースのプロモーター領域を用いたレポーター遺伝子アッセイにより、PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの発現調節に対する被験物質の作用はレポーター遺伝子の発現に置き換えて検出することができる。配列番号5で表される塩基配列からなるp68 RNA ヘリケースのプロモーター領域と融合された「レポーター遺伝子」は、一般に用いられるものであれば特に限定されないが、定量的測定が容易な酵素遺伝子などが好ましい。例えば、バクテリアトランスポゾン由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（CAT）、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子（Luc）、クラゲ由来の緑色蛍光蛋白質遺伝子（GFP）等があげられる。レポーター遺伝子は、配列番号5で表される塩基配列からなるp68 RNA ヘリケースのプロモーター領域と機能的に融合されていればよい。p68 RNA ヘリ

ケースのプロモーター領域と融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞に被検物質を接触した場合と接触しなかった場合のレポーター遺伝子の発現量を比較することにより被検物質依存的な転写誘導活性の変化を分析することができる。上記工程を実施することにより、PPAR相互作用p68 RNAヘリケースの発現を亢進する物質並びにインスリン抵抗性を改善する物質のスクリーニングを実施できる。具体的には、実施例5に記載の方法により、前記スクリーニングを実施できる。

#### 【0014】

本発明のスクリーニング法で使用する被検物質としては、特に限定されるものではないが、例えば、市販の化合物（ペプチドを含む）、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物（ペプチドを含む）、コンビナトリアル・ケミストリー技術（Terrettら、J.Steele.Tetrahedron、第51巻、第8135-8173頁、1995年）によって得られた化合物群、微生物の培養上清、植物や海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物、あるいは、本発明のスクリーニング法により選択された化合物（ペプチドを含む）を化学的又は生物学的に修飾した化合物（ペプチドを含む）を挙げることができる。

#### 【0015】

##### 【実施例】

以下、実施例によって本発明を詳述するが、本発明は該実施例によって限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法（「Molecular Cloning」Sambrook, Jら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年、等）に従って実施可能である。また、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って実施可能である。

#### 【0016】

<実施例1>PPAR $\gamma$  AF-1領域結合蛋白質の同定

(1) PPAR $\gamma$  遺伝子の単離と動物細胞発現用プラスミドpcDNA-PPAR $\gamma$ の作製  
配列番号6及び7に示したプライマーを用いて、ヒト脂肪組織cDNAライブラリー（クロンテック社）からPCR法（DNAポリメラーゼ（LA Taq DNA polymerase；宝

酒造社)を用い、94℃(5分)の後、94℃(30秒)、55℃(30秒)、72℃(90秒)のサイクルを35回繰り返した後72℃で7分加温)によりPPAR $\gamma$  2の全長域をコードする1518bp(ベースペア)を含むcDNA断片を取得した。ヒトPPAR $\gamma$  2の全長をコードするcDNAを動物細胞発現ベクターpcDNA3.1/V5-His-TOPOベクター(インビトロジェン社)にin vitro 組換えによるTOPOクローニング法(インビトロジェン社)により挿入して動物細胞発現用プラスミドpcDNA-PPAR $\gamma$ を作製した。

(2) グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質発現用プラスミドpGEX-PPAR $\gamma$ -AF-1の作製とGST-PPAR $\gamma$ -AF-1融合蛋白質の発現  
配列番号6及び8に示したプライマーを用いて、実施例1の(1)で作製したpcDNA-PPAR $\gamma$ を鋳型としてPCR法(DNAポリメラーゼ(Taq DNA polymerase; シグマ社)を用い、94℃(5分)の後、94℃(30秒)、55℃(30秒)、72℃(30秒)のサイクルを25回繰り返した後72℃で7分加温)によりPPAR $\gamma$ のAF-1領域を含む領域をコードする約600bpのcDNA断片を取得した。これを制限酵素(EcoRIおよびNotI; 宝酒造社)処理し、同様に制限酵素処理したpGEX-6P-1(アマシャムバイオサイエンス社)プラスミドに挿入してGST融合タンパク質発現用プラスミドpGEX-PPAR $\gamma$ -AF-1を作製した。このプラスミドで形質転換した大腸菌を37℃で3時間培養した後、イソプロピルー $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド(IPTG; ナカライテスク社)を最終濃度2.5 mMで添加して融合蛋白質の発現を誘導し、さらに27℃で6時間培養した。その後この大腸菌を回収し、超音波発生装置(201M; クボタ社)により細胞を破碎してGST-PPAR $\gamma$ -AF-1融合蛋白質を調製した。

### (3) GSTプルダウンアッセイ

実施例1の(2)で調製したGST-PPAR $\gamma$ -AF-1融合蛋白質をゲル(グルタチオンセファロース4B; アマシャムファルマシア社)に結合させた後、このゲルを適当な緩衝液で洗浄して非特異的な蛋白質の結合を除いた。p68 RNAヘリケース発現ベクター、pSG5-p68(Endohら、Mol. Cell. Biol.、第19巻、第5363-5372頁、1999年)を鋳型として、キット添付のプロトコールに従い試験管内発現系(TNT(商標) T7 Quick Coupled Transcription/ Translation System; プロメガ社)と放射ラベルメチオニン(EASYTAG<sup>TM</sup> EXPRESS PROTEIN LABELING MIX [<sup>35</sup>S]-; NEN

ライフサイエンス社)で放射ラベルした全長p68 RNA ヘリケース蛋白質を前記の GST-PPAR $\gamma$ -AF-1融合蛋白質を結合したゲルに混ぜて4℃で1時間結合反応をさせた後洗浄した。これをドデシル硫酸ナトリウム変性ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し (SDS-PAGE)、イメージングアナライザー (Typhoon 8600; ファルマシアバイオサイエンス社) により解析した。その結果、PPAR $\gamma$  のAF-1領域とp68 RNA ヘリケースとの結合が確認された。これによりp68 RNA ヘリケースがPPAR $\gamma$  のAF-1領域に結合する因子であることが明らかとなった。

#### 【0017】

<実施例2>PPAR $\gamma$  のリガンド存在下での転写誘導能に対するp68 RNA ヘリケースの調節作用の検出

上述の結果から、p68 RNA ヘリケースはPPAR $\gamma$  のAF-1領域と相互作用することが示された。そこでp68 RNA ヘリケースがPPAR $\gamma$  の有する転写誘導活性にどのような影響を及ぼすか、培養細胞COS-1を用いたレポーターアッセイで調査した。PPAR $\gamma$  のリガンドとして作用することが報告されているチアゾリジン誘導体、ピオグリタゾン (pioglitazone、(+)-5-[4-[2-(5-エチル-2-ピリジニル)エトキシ]ベンジル]-2,4-チアゾリジンジオン; 武田薬品工業、特許1853588号) は特許明細書の方法に従って合成した。

##### (1) PPAR $\gamma$ の転写誘導能に対するp68 RNA ヘリケースの調節作用の検出

培養細胞COS-1細胞は96ウェル培養プレートプレート (旭テクノグラス社) で90%コンフルエントの状態になるまで各ウェル10%牛胎児血清 (シグマ社) を含む100  $\mu$ lの最少必須培地DMEM (ギブコ社) 中で培養した。この細胞にリポフェクション試薬 (リポフェクトアミン2000; インビトロジェン社) を用いて、リポフェクション試薬添付のプロトコールに従い、以下 (A)、(B)、(C)、及び (D) を一過性にコトランスフェクトした。

(A) 実施例1の(1)により作製したpcDNA-PPAR $\gamma$  (30 ng/ウェル)

(B) PPAR結合配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に配置したレポーターコンストラクト (Kliewerら、Nature、第358巻、第771-774頁、1992年) (100 ng/ウェル)

(C) p68 RNA ヘリケース発現ベクター、pSG5-p68 (Endohら、Mol. Cell. Biol、

第19巻、第5363-5372頁、1999年) (0-10 ng/ウェル)

(D)  $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現遺伝子をもつプラスミドpSV- $\beta$ -ガラクトシダーゼコントロールベクター (プロメガ社) 10 ng/ウェル

PPAR $\gamma$  アゴニストであるピオグリタゾンを経最終濃度30 nMとなるように前記コントロールトランスフェクトした細胞に添加して24時間培養した後、培地を除去し、細胞をリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄した。1ウェルあたり80  $\mu$ lの細胞溶解液 (100 mM リン酸カリウム (pH7.8)、0.2 %トリトンX-100) を添加して細胞を溶解した。この細胞溶解液20  $\mu$ lにルシフェラーゼ基質溶液100  $\mu$ l (和光純薬工業社) を添加し、化学発光測定装置 (ML3000型; ダイナテックラボトリーズ社) を用いて発光量を測定した。また、別途、前記細胞溶解液の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性検出キット (Galacto-Light Plus<sup>TM</sup> system; アプライドバイオシステム社) を用いて測定・数値化した。これを導入遺伝子のトランスフェクション効率として上述のルシフェラーゼ活性を各ウェル毎に補正した。

上記実験の結果、PPAR $\gamma$  のアゴニスト依存的な転写誘導活性は、p68 RNA ヘリケースを共発現することにより、p68RNAヘリケース量依存的に促進されることがわかった (図1)。この事実は、p68 RNA ヘリケースがPPAR $\gamma$  の転写誘導共役因子の一つであることを明らかにしている。これを利用して、p68 RNA ヘリケースの量を増やせば、生体のエネルギー源を糖代謝へ向かわせ血糖値を降下させることが可能である。すなわち、p68 RNA ヘリケースの量が増えることでPPAR $\gamma$  の転写誘導能がより亢進する結果、PPAR $\gamma$  アゴニスト同様の作用、つまりインスリン抵抗性改善作用を期待することが出来る。本実験系で、PPAR $\gamma$  の転写誘導活性を促進する物質並びにインスリン抵抗性を改善する物質の検出及び/又はスクリーニングが可能となった。

#### 【0018】

<実施例3> ヒト組織におけるp68 RNA ヘリケースの発現確認

配列番号9及び10に示したプライマーを用いて、ヒトcDNAライブラリー (クロンテック社) からPCR法 (DNAポリメラーゼ (Taq DNA polymerase; シグマ社) を用い、94  $^{\circ}$ C (5分) の後、94 $^{\circ}$ C (30秒)、55 $^{\circ}$ C (30秒)、72  $^{\circ}$ C (30秒) のサイクルを35回繰り返し、72  $^{\circ}$ Cで7分加温) によりp68 RNA ヘリケースをコー

ドする約800bpのcDNA断片の増幅をアガロースゲル電気泳動法により検出した。その結果、p68 RNA ヘリケースは、PPAR $\gamma$ の作用があることが知られている脂肪組織及び筋肉で発現していることを見出した。これにより発現部位からもp68 RNA ヘリケースがPPAR $\gamma$ の転写共役因子であることが裏付けられた。

#### 【0019】

<実施例4>3T3L1細胞の脂肪細胞への分化過程におけるp68 RNA ヘリケースmRNA発現量の比較

培養細胞3T3L1細胞は培養プレート（直径60 mm;旭テクノグラス社）に10 %牛胎児血清（シグマ社）を含む最少必須培地DMEM（ギブコ社）2 mlを加えてコンフルエントの状態になるまで培養した。その後、分化用培地（最少必須培地DMEM（ギブコ社）にインスリン（最終濃度10  $\mu$ g/ml;シグマ社）、デキサメサゾン（最終濃度250  $\mu$ M;シグマ社）および3-イソブチル-1-メトキシシルキサンチン（最終濃度500  $\mu$ M;シグマ社）を加えたもの）に交換し、これにインスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾン（最終濃度1  $\mu$ M）を添加したものと添加しなかったものとのp68 RNA ヘリケースの発現量に変化が生じるか否かを調査した。ピオグリタゾンを添加して24時間後に細胞を回収し、RNA抽出試薬（ISOGEN;和光純薬工業社）を用いてRNAを抽出して逆転写反応キット（Thermoscript RT-PCR System;インビトロジェン社）を使って逆転写反応を行ったものを鋳型として、配列番号11および12に示したプライマーと検出試薬（2x SYBR Green Master Mix;アプライドバイオシステム社）を用いてリアルタイムPCR法（プリズム7700シーケンスディテクションシステム;アプライドバイオシステム社）によりp68 RNA ヘリケースの発現量の変化を調べた。その結果、ピオグリタゾンを添加したものは非添加のものに比較してp68 RNA ヘリケースの発現量が約1.7倍となっていることが明らかとなった。これによりインスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾンは、p68 RNA ヘリケースの発現量を亢進させる作用を有しており、したがって、p68 RNA ヘリケースの発現亢進が、インスリン抵抗性を改善することが裏付けられた。

#### 【0020】

<実施例5>p68 RNA ヘリケース遺伝子のプロモーター活性の検出

(1) p68 RNA ヘリケース遺伝子のプロモーター領域の単離とレポーターベクターの作製

先に報告されているp68 RNA ヘリケース遺伝子のプロモーターの塩基配列 (Rosslerら、Nucleic Acids Res.、第28巻、第932-939頁、2000年) およびヒトゲノムDNA配列 (GenBank accession 番号AC009994) を基に設計した配列番号13および14のプライマーを用いてヒトゲノムDNA (クロンテック社) を鋳型として、PCR法 (DNAポリメラーゼ (LA Taq DNA polymerase; 宝酒造社) を用い、98℃ (5分) の後、96℃ (30秒)、55℃ (30秒)、72 ° C (90秒) のサイクルを35回繰り返した後72 ° Cで7分加温) によりp68 RNA ヘリケース遺伝子のプロモーター領域を含む配列番号5で示されるDNA断片を収得した。このDNA断片を制限酵素 (KpnIおよびXhoI; 宝酒造社) で処理し、同様に制限酵素処理したルシフェラーゼレポーターベクター (pGL3-Basicベクター; プロメガ社) に連結してp68 RNA ヘリケース遺伝子プロモーター連結レポーターベクター (pGL3-p68-1184bp) を構築した。さらに、このpGL3-p68-1184bpを制限酵素 (NheIおよびXhoI; 宝酒造社) で処理して得られたp68 RNA ヘリケース遺伝子のプロモーター領域を-899bpまで含んだDNA断片を、同様に制限酵素処理したpGL3-Basicベクターに連結し、p68 RNA ヘリケース遺伝子プロモーター連結レポーターベクター (pGL3-p68-899bp) を構築した。

(2) p68 RNA ヘリケース遺伝子のプロモーター活性の検出

実施例5の(1)で構築したpGL3-p68-899bp、pGL3-p68-1184bp、又は陰性対照としてpGL3-Basic (100 ng/ウェル) をそれぞれ $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現ベクター (pSV- $\beta$ -ガラクトシダーゼコントロールベクター; プロメガ社) (10 ng/ウェル) とCOS-1細胞に一過性にコトランスフェクトした。コトランスフェクトは実施例2の(1)と同様の方法で行った。48時間培養した後、実施例2と同様にルシフェラーゼ発光量を測定した。また、実施例2と同様に $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定してこれを導入遺伝子のトランスフェクション効率として上述のルシフェラーゼ活性を各ウェル毎に補正した。

上記実験の結果、p68 RNA ヘリケース遺伝子のプロモーター活性は陰性対照であるpGL3-Basicに比して非常に強いことが明らかとなった (pGL3-p68-1184bpの時p



GL3-Basicの約202倍、pGL3-p68-899bpの時pGL3-Basicの約94倍)。またpGL3-p68-899bpに比してpGL3-p68-1184bpで得られた活性が約半分であったことから、-1184bpから-899bpまでの領域が転写抑制性調節に関与していることが明らかとなった。この抑制性調節を解除する作用をもつ化合物は、結果としてp68 RNA ヘリケース遺伝子の転写を亢進する作用があると期待され、pGL3-p68-1184bpを用いた本発明によりこのような化合物をスクリーニングすることが可能となった。

### (3) p68 RNA ヘリケース遺伝子のプロモーター活性に対するインスリン抵抗性改善薬の調節作用の検出

インスリン抵抗性改善薬の一つであるピオグリタゾンを経最終濃度 $10\mu\text{M}$ となるように実施例5の(2)でコトランスフェクトした細胞に添加して24時間培養した後、実施例2と同様にルシフェラーゼ発光量を測定した。また、実施例2と同様に $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定してこれを導入遺伝子のトランスフェクション効率として上述のルシフェラーゼ活性を各ウェル毎に補正した。

上記実験の結果、インスリン抵抗性改善薬依存的にp68 RNA ヘリケース遺伝子のプロモーター活性の亢進が認められた(図2)。この事実は、p68 RNA ヘリケース遺伝子の転写がインスリン抵抗性改善薬の一つであるピオグリタゾンによって亢進されることを明らかにし、インスリン抵抗性改善の機構がp68 RNA ヘリケース遺伝子の転写活性化であることを明らかにしている。

また、インスリン抵抗性改善薬の一つであるピオグリタゾンによるp68 RNA ヘリケース遺伝子のプロモーター活性の亢進はpGL3-p68-899bpおよびpGL3-p68-1184bpの両方で同様に認められたことから、ピオグリタゾンによる転写活性化の作用点は-899bpより・下流側に存在すると考えられ、-1184bpから-899bpまでの領域による転写抑制性調節の解除ではないことが明らかとなった。したがって、このp68 RNA ヘリケース遺伝子の抑制性調節を解除する作用を持つ化合物のスクリーニング、より具体的にはpGL3-p68-1184bpのレポーター活性をより亢進させる化合物のスクリーニングにより従来のインスリン抵抗性改善薬とは異なるp68 RNA ヘリケースの発現量を亢進する物質並びにインスリン抵抗性を改善する物質を検出及び／又はスクリーニングすることが可能になった。

これらのことより、p68 RNA ヘリケースの発現亢進がインスリン抵抗性を改善す

る可能性が裏付けられた。これを利用して、p68 RNA ヘリケースの量を増やせば、生体のエネルギー源を糖代謝へ向かわせ血糖値を降下させることが可能である。本実験系でインスリン抵抗性を改善する物質の検出及び／又はスクリーニングが可能となった。

この事実と、脂肪組織を含む組織でp68 RNA ヘリケースが発現しており、p68 RNA ヘリケースがPPAR $\gamma$ のAF-1領域に結合し、その転写誘導共役因子として機能するという本発明者による発見は、該分子の機能における新規の知見である。本実験系により、p68 RNA ヘリケース発現量を亢進する物質並びにインスリン抵抗性を改善する物質を検出及び／又はスクリーニングすることが可能となった。

#### 【0021】

##### 【発明の効果】

本発明の、PPAR $\gamma$ とPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの相互作用を利用したスクリーニング系、及びPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの発現亢進を利用したスクリーニング系は、従来のインスリン抵抗性改善薬であるPPAR $\gamma$ 合成リガンドとは異なる新しいタイプの薬剤のスクリーニングに利用できる。本発明の細胞は、前記スクリーニング系の構築に利用できる。

#### 【0022】

##### 【配列表フリーテキスト】

以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号6、7、8、10、13、14の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。

#### 【0023】

##### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> A screening method for detecting PPAR modulators

using p68 RNA helicase

<130> 3159PPM

<140>

<141>

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1845

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1845)

<400> 1

atg tcg ggt tat tcg agt gac cga gac cgc ggc cgg gac cga ggg ttt 48

Met Ser Gly Tyr Ser Ser Asp Arg Asp Arg Gly Arg Asp Arg Gly Phe

1

5

10

15

ggt gca cct cga ttt gga gga agt agg gca ggg ccc tta tct gga aag 96

Gly Ala Pro Arg Phe Gly Gly Ser Arg Ala Gly Pro Leu Ser Gly Lys

20

25

30

aag ttt gga aac cct ggg gag aaa tta gtt aaa aag aag tgg aat ctt 144  
 Lys Phe Gly Asn Pro Gly Glu Lys Leu Val Lys Lys Lys Trp Asn Leu  
 35 40 45

gat gag ctg cct aaa ttt gag aag aat ttt tat caa gag cac cct gat 192  
 Asp Glu Leu Pro Lys Phe Glu Lys Asn Phe Tyr Gln Glu His Pro Asp  
 50 55 60

ttg gct agg cgc aca gca caa gag gtg gaa aca tac aga aga agc aag 240  
 Leu Ala Arg Arg Thr Ala Gln Glu Val Glu Thr Tyr Arg Arg Ser Lys  
 65 70 75 80

gaa att aca gtt aga ggt cac aac tgc ccg aag cca gtt cta aat ttt 288  
 Glu Ile Thr Val Arg Gly His Asn Cys Pro Lys Pro Val Leu Asn Phe  
 85 90 95

tat gaa gcc aat ttc cct gca aat gtc atg gat gtt att gca aga cag 336  
 Tyr Glu Ala Asn Phe Pro Ala Asn Val Met Asp Val Ile Ala Arg Gln  
 100 105 110

aat ttc act gaa ccc act gct att caa gct cag gga tgg cca gtt gct 384  
 Asn Phe Thr Glu Pro Thr Ala Ile Gln Ala Gln Gly Trp Pro Val Ala  
 115 120 125

cta agt gga ttg gat atg gtt gga gtg gca cag act gga tct ggg aaa 432  
 Leu Ser Gly Leu Asp Met Val Gly Val Ala Gln Thr Gly Ser Gly Lys  
 130 135 140

aca ttg tct tat ttg ctt cct gcc att gtc cac atc aat cat cag cca 480

Thr Leu Ser Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile Asn His Gln Pro  
145 150 155 160

ttc cta gag aga ggc gat ggg cct att tgt ttg gtg ctg gca cca act 528  
Phe Leu Glu Arg Gly Asp Gly Pro Ile Cys Leu Val Leu Ala Pro Thr  
165 170 175

cgg gaa ctg gcc caa cag gtg cag caa gta gct gct gaa tat tgt aga 576  
Arg Glu Leu Ala Gln Gln Val Gln Gln Val Ala Ala Glu Tyr Cys Arg  
180 185 190

gca tgt cgc ttg aag tct act tgt atc tac ggt ggt gct cct aag gga 624  
Ala Cys Arg Leu Lys Ser Thr Cys Ile Tyr Gly Gly Ala Pro Lys Gly  
195 200 205

cca caa ata cgt gat ttg gag aga ggt gtg gaa atc tgt att gca aca 672  
Pro Gln Ile Arg Asp Leu Glu Arg Gly Val Glu Ile Cys Ile Ala Thr  
210 215 220

cct gga aga ctg att gac ttt tta gag tgt gga aaa acc aat ctg aga 720  
Pro Gly Arg Leu Ile Asp Phe Leu Glu Cys Gly Lys Thr Asn Leu Arg  
225 230 235 240

aga aca acc tac ctt gtc ctt gat gaa gca gat aga atg ctt gat atg 768  
Arg Thr Thr Tyr Leu Val Leu Asp Glu Ala Asp Arg Met Leu Asp Met  
245 250 255

ggc ttt gaa ccc caa ata agg aag att gtg gat caa ata aga cct gat 816  
Gly Phe Glu Pro Gln Ile Arg Lys Ile Val Asp Gln Ile Arg Pro Asp

260

265

270

agg caa act cta atg tgg agt gcg act tgg cca aaa gaa gta aga cag 864

Arg Gln Thr Leu Met Trp Ser Ala Thr Trp Pro Lys Glu Val Arg Gln

275

280

285

ctt gct gaa gat ttc ctg aaa gac tat att cat ata aac att ggt gca 912

Leu Ala Glu Asp Phe Leu Lys Asp Tyr Ile His Ile Asn Ile Gly Ala

290

295

300

ctt gaa ctg agt gca aac cac aac att ctt cag att gtg gat gtg tgt 960

Leu Glu Leu Ser Ala Asn His Asn Ile Leu Gln Ile Val Asp Val Cys

305

310

315

320

cat gac gta gaa aag gat gaa aaa ctt att cgt cta atg gaa gag atc 1008

His Asp Val Glu Lys Asp Glu Lys Leu Ile Arg Leu Met Glu Glu Ile

325

330

335

atg agt gag aag gag aat aaa acc att gtt ttt gtg gaa acc aaa aga 1056

Met Ser Glu Lys Glu Asn Lys Thr Ile Val Phe Val Glu Thr Lys Arg

340

345

350

aga tgt gat gag ctt acc aga aaa atg agg aga gat ggg tgg cct gcc 1104

Arg Cys Asp Glu Leu Thr Arg Lys Met Arg Arg Asp Gly Trp Pro Ala

355

360

365

atg ggt atc cat ggt gac aag agt caa caa gag cgt gac tgg gtt cta 1152

Met Gly Ile His Gly Asp Lys Ser Gln Gln Glu Arg Asp Trp Val Leu

370

375

380

aat gaa ttc aaa cat gga aaa gct cct att ctg att gct aca gat gtg 1200

Asn Glu Phe Lys His Gly Lys Ala Pro Ile Leu Ile Ala Thr Asp Val

385

390

395

400

gcc tcc aga ggg cta gat gtg gaa gat gtg aaa ttt gtc atc aat tat 1248

Ala Ser Arg Gly Leu Asp Val Glu Asp Val Lys Phe Val Ile Asn Tyr

405

410

415

gac tac cct aac tcc tca gag gat tat att cat cga att gga aga act 1296

Asp Tyr Pro Asn Ser Ser Glu Asp Tyr Ile His Arg Ile Gly Arg Thr

420

425

430

gct cgc agt acc aaa aca ggc aca gca tac act ttc ttt aca cct aat 1344

Ala Arg Ser Thr Lys Thr Gly Thr Ala Tyr Thr Phe Phe Thr Pro Asn

435

440

445

aac ata aag caa gtg agc gac ctt atc tct gtg ctt cgt gaa gct aat 1392

Asn Ile Lys Gln Val Ser Asp Leu Ile Ser Val Leu Arg Glu Ala Asn

450

455

460

caa gca att aat ccc aag ttg ctt cag ttg gtc gaa gac aga ggt tca 1440

Gln Ala Ile Asn Pro Lys Leu Leu Gln Leu Val Glu Asp Arg Gly Ser

465

470

475

480

ggt cgt tcc agg ggt aga gga ggc atg aag gat gac cgt cgg gac aga 1488

Gly Arg Ser Arg Gly Arg Gly Gly Met Lys Asp Asp Arg Arg Asp Arg

485

490

495

tac tct gcg ggc aaa agg ggt gga ttt aat acc ttt aga gac agg gaa 1536  
Tyr Ser Ala Gly Lys Arg Gly Gly Phe Asn Thr Phe Arg Asp Arg Glu

500

505

510

aat tat gac aga ggt tac tct agc ctg ctt aaa aga gat ttt ggg gca 1584  
Asn Tyr Asp Arg Gly Tyr Ser Ser Leu Leu Lys Arg Asp Phe Gly Ala

515

520

525

aaa act cag aat ggt gtt tac agt gct gca aat tac acc aat ggg agc 1632  
Lys Thr Gln Asn Gly Val Tyr Ser Ala Ala Asn Tyr Thr Asn Gly Ser

530

535

540

ttt gga agt aat ttt gtg tct gct ggt ata cag acc agt ttt agg act 1680  
Phe Gly Ser Asn Phe Val Ser Ala Gly Ile Gln Thr Ser Phe Arg Thr  
545 550 555 560

ggt aat cca aca ggg act tac cag aat ggt tat gat agc act cag caa 1728  
Gly Asn Pro Thr Gly Thr Tyr Gln Asn Gly Tyr Asp Ser Thr Gln Gln

565

570

575

tac gga agt aat gtt cca aat atg cac aat ggt atg aac caa cag gca 1776  
Tyr Gly Ser Asn Val Pro Asn Met His Asn Gly Met Asn Gln Gln Ala

580

585

590

tat gca tat cct gct act gca gct gca cct atg att ggt tat cca atg 1824  
Tyr Ala Tyr Pro Ala Thr Ala Ala Ala Pro Met Ile Gly Tyr Pro Met

595

600

605

cca aca gga tat tcc caa taa

1845



Pro Thr Gly Tyr Ser Gln

610

615

<210> 2

<211> 614

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Gly Tyr Ser Ser Asp Arg Asp Arg Gly Arg Asp Arg Gly Phe

1

5

10

15

Gly Ala Pro Arg Phe Gly Gly Ser Arg Ala Gly Pro Leu Ser Gly Lys

20

25

30

Lys Phe Gly Asn Pro Gly Glu Lys Leu Val Lys Lys Lys Trp Asn Leu

35

40

45

Asp Glu Leu Pro Lys Phe Glu Lys Asn Phe Tyr Gln Glu His Pro Asp

50

55

60

Leu Ala Arg Arg Thr Ala Gln Glu Val Glu Thr Tyr Arg Arg Ser Lys

65

70

75

80

Glu Ile Thr Val Arg Gly His Asn Cys Pro Lys Pro Val Leu Asn Phe

85

90

95

Tyr Glu Ala Asn Phe Pro Ala Asn Val Met Asp Val Ile Ala Arg Gln

100

105

110

Asn Phe Thr Glu Pro Thr Ala Ile Gln Ala Gln Gly Trp Pro Val Ala

115

120

125

Leu Ser Gly Leu Asp Met Val Gly Val Ala Gln Thr Gly Ser Gly Lys

130

135

140

Thr Leu Ser Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile Asn His Gln Pro

145	150	155	160
Phe Leu Glu Arg Gly Asp Gly Pro Ile Cys Leu Val Leu Ala Pro Thr			
	165	170	175
Arg Glu Leu Ala Gln Gln Val Gln Gln Val Ala Ala Glu Tyr Cys Arg			
	180	185	190
Ala Cys Arg Leu Lys Ser Thr Cys Ile Tyr Gly Gly Ala Pro Lys Gly			
	195	200	205
Pro Gln Ile Arg Asp Leu Glu Arg Gly Val Glu Ile Cys Ile Ala Thr			
	210	215	220
Pro Gly Arg Leu Ile Asp Phe Leu Glu Cys Gly Lys Thr Asn Leu Arg			
	225	230	235
Arg Thr Thr Tyr Leu Val Leu Asp Glu Ala Asp Arg Met Leu Asp Met			
	245	250	255
Gly Phe Glu Pro Gln Ile Arg Lys Ile Val Asp Gln Ile Arg Pro Asp			
	260	265	270
Arg Gln Thr Leu Met Trp Ser Ala Thr Trp Pro Lys Glu Val Arg Gln			
	275	280	285
Leu Ala Glu Asp Phe Leu Lys Asp Tyr Ile His Ile Asn Ile Gly Ala			
	290	295	300
Leu Glu Leu Ser Ala Asn His Asn Ile Leu Gln Ile Val Asp Val Cys			
	305	310	315
His Asp Val Glu Lys Asp Glu Lys Leu Ile Arg Leu Met Glu Glu Ile			
	325	330	335
Met Ser Glu Lys Glu Asn Lys Thr Ile Val Phe Val Glu Thr Lys Arg			
	340	345	350
Arg Cys Asp Glu Leu Thr Arg Lys Met Arg Arg Asp Gly Trp Pro Ala			
	355	360	365
Met Gly Ile His Gly Asp Lys Ser Gln Gln Glu Arg Asp Trp Val Leu			
	370	375	380

Asn Glu Phe Lys His Gly Lys Ala Pro Ile Leu Ile Ala Thr Asp Val  
 385 390 395 400  
 Ala Ser Arg Gly Leu Asp Val Glu Asp Val Lys Phe Val Ile Asn Tyr  
 405 410 415  
 Asp Tyr Pro Asn Ser Ser Glu Asp Tyr Ile His Arg Ile Gly Arg Thr  
 420 425 430  
 Ala Arg Ser Thr Lys Thr Gly Thr Ala Tyr Thr Phe Phe Thr Pro Asn  
 435 440 445  
 Asn Ile Lys Gln Val Ser Asp Leu Ile Ser Val Leu Arg Glu Ala Asn  
 450 455 460  
 Gln Ala Ile Asn Pro Lys Leu Leu Gln Leu Val Glu Asp Arg Gly Ser  
 465 470 475 480  
 Gly Arg Ser Arg Gly Arg Gly Gly Met Lys Asp Asp Arg Arg Asp Arg  
 485 490 495  
 Tyr Ser Ala Gly Lys Arg Gly Gly Phe Asn Thr Phe Arg Asp Arg Glu  
 500 505 510  
 Asn Tyr Asp Arg Gly Tyr Ser Ser Leu Leu Lys Arg Asp Phe Gly Ala  
 515 520 525  
 Lys Thr Gln Asn Gly Val Tyr Ser Ala Ala Asn Tyr Thr Asn Gly Ser  
 530 535 540  
 Phe Gly Ser Asn Phe Val Ser Ala Gly Ile Gln Thr Ser Phe Arg Thr  
 545 550 555 560  
 Gly Asn Pro Thr Gly Thr Tyr Gln Asn Gly Tyr Asp Ser Thr Gln Gln  
 565 570 575  
 Tyr Gly Ser Asn Val Pro Asn Met His Asn Gly Met Asn Gln Gln Ala  
 580 585 590  
 Tyr Ala Tyr Pro Ala Thr Ala Ala Ala Pro Met Ile Gly Tyr Pro Met  
 595 600 605  
 Pro Thr Gly Tyr Ser Gln

610

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1518

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1518)

&lt;400&gt; 3

atg ggt gaa act ctg gga gat tct cct att gac cca gaa agc gat tcc 48  
Met Gly Glu Thr Leu Gly Asp Ser Pro Ile Asp Pro Glu Ser Asp Ser  
1 5 10 15

ttc act gat aca ctg tct gca aac ata tca caa gaa atg acc atg gtt 96  
Phe Thr Asp Thr Leu Ser Ala Asn Ile Ser Gln Glu Met Thr Met Val  
20 25 30

gac aca gag atg cca ttc tgg ccc acc aac ttt ggg atc agc tcc gtg 144  
Asp Thr Glu Met Pro Phe Trp Pro Thr Asn Phe Gly Ile Ser Ser Val  
35 40 45

gat ctc tcc gta atg gaa gac cac tcc cac tcc ttt gat atc aag ccc 192  
Asp Leu Ser Val Met Glu Asp His Ser His Ser Phe Asp Ile Lys Pro  
50 55 60

ttc act act gtt gac ttc tcc agc att tct act cca cat tac gaa gac 240

Phe Thr Thr Val Asp Phe Ser Ser Ile Ser Thr Pro His Tyr Glu Asp

65

70

75

80

att cca ttc aca aga aca gat cca gtg gtt gca gat tac aag tat gac 288

Ile Pro Phe Thr Arg Thr Asp Pro Val Val Ala Asp Tyr Lys Tyr Asp

85

90

95

ctg aaa ctt caa gag tac caa agt gca atc aaa gtg gag cct gca tct 336

Leu Lys Leu Gln Glu Tyr Gln Ser Ala Ile Lys Val Glu Pro Ala Ser

100

105

110

cca cct tat tat tct gag aag act cag ctc tac aat aag cct cat gaa 384

Pro Pro Tyr Tyr Ser Glu Lys Thr Gln Leu Tyr Asn Lys Pro His Glu

115

120

125

gag cct tcc aac tcc ctc atg gca att gaa tgt cgt gtc tgt gga gat 432

Glu Pro Ser Asn Ser Leu Met Ala Ile Glu Cys Arg Val Cys Gly Asp

130

135

140

aaa gct tct gga ttt cac tat gga gtt cat gct tgt gaa gga tgc aag 480

Lys Ala Ser Gly Phe His Tyr Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys

145

150

155

160

ggc ttc ttc cgg aga aca atc aga ttg aag ctt atc tat gac aga tgt 528

Gly Phe Phe Arg Arg Thr Ile Arg Leu Lys Leu Ile Tyr Asp Arg Cys

165

170

175

gat ctt aac tgt cgg atc cac aaa aaa agt aga aat aaa tgt cag tac 576

Asp Leu Asn Cys Arg Ile His Lys Lys Ser Arg Asn Lys Cys Gln Tyr

180

185

190

tgt cgg ttt cag aaa tgc ctt gca gtg ggg atg tct cat aat gcc atc 624

Cys Arg Phe Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Ser His Asn Ala Ile

195

200

205

agg ttt ggg cgg atg cca cag gcc gag aag gag aag ctg ttg gcg gag 672

Arg Phe Gly Arg Met Pro Gln Ala Glu Lys Glu Lys Leu Leu Ala Glu

210

215

220

atc tcc agt gat atc gac cag ctg aat cca gag tcc gct gac ctc cgg 720

Ile Ser Ser Asp Ile Asp Gln Leu Asn Pro Glu Ser Ala Asp Leu Arg

225

230

235

240

gcc ctg gca aaa cat ttg tat gac tca tac ata aag tcc ttc ccg ctg 768

Ala Leu Ala Lys His Leu Tyr Asp Ser Tyr Ile Lys Ser Phe Pro Leu

245

250

255

acc aaa gca aag gcg agg gcg atc ttg aca gga aag aca aca gac aaa 816

Thr Lys Ala Lys Ala Arg Ala Ile Leu Thr Gly Lys Thr Thr Asp Lys

260

265

270

tca cca ttc gtt atc tat gac atg aat tcc tta atg atg gga gaa gat 864

Ser Pro Phe Val Ile Tyr Asp Met Asn Ser Leu Met Met Gly Glu Asp

275

280

285

aaa atc aag ttc aaa cac atc acc ccc ctg cag gag cag agc aaa gag 912

Lys Ile Lys Phe Lys His Ile Thr Pro Leu Gln Glu Gln Ser Lys Glu  
290 295 300

gtg gcc atc cgc atc ttt cag ggc tgc cag ttt cgc tcc gtg gag gct 960  
Val Ala Ile Arg Ile Phe Gln Gly Cys Gln Phe Arg Ser Val Glu Ala  
305 310 315 320

gtg cag gag atc aca gag tat gcc aaa agc att cct ggt ttt gta aat 1008  
Val Gln Glu Ile Thr Glu Tyr Ala Lys Ser Ile Pro Gly Phe Val Asn  
325 330 335

ctt gac ttg aac gac caa gta act ctc ctc aaa tat gga gtc cac gag 1056  
Leu Asp Leu Asn Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Tyr Gly Val His Glu  
340 345 350

atc att tac aca atg ctg gcc tcc ttg atg aat aaa gat ggg gtt ctc 1104  
Ile Ile Tyr Thr Met Leu Ala Ser Leu Met Asn Lys Asp Gly Val Leu  
355 360 365

ata tcc gag ggc caa ggc ttc atg aca agg gag ttt cta aag agc ctg 1152  
Ile Ser Glu Gly Gln Gly Phe Met Thr Arg Glu Phe Leu Lys Ser Leu  
370 375 380

cga aag cct ttt ggt gac ttt atg gag ccc aag ttt gag ttt gct gtg 1200  
Arg Lys Pro Phe Gly Asp Phe Met Glu Pro Lys Phe Glu Phe Ala Val  
385 390 395 400

aag ttc aat gca ctg gaa tta gat gac agc gac ttg gca ata ttt att 1248  
Lys Phe Asn Ala Leu Glu Leu Asp Asp Ser Asp Leu Ala Ile Phe Ile

405

410

415

gct gtc att att ctc agt gga gac cgc cca ggt ttg ctg aat gtg aag 1296

Ala Val Ile Ile Leu Ser Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Lys

420

425

430

ccc att gaa gac att caa gac aac ctg cta caa gcc ctg gag ctc cag 1344

Pro Ile Glu Asp Ile Gln Asp Asn Leu Leu Gln Ala Leu Glu Leu Gln

435

440

445

ctg aag ctg aac cac cct gag tcc tca cag ctg ttt gcc aag ctg ctc 1392

Leu Lys Leu Asn His Pro Glu Ser Ser Gln Leu Phe Ala Lys Leu Leu

450

455

460

cag aaa atg aca gac ctc aga cag att gtc acg gaa cac gtg cag cta 1440

Gln Lys Met Thr Asp Leu Arg Gln Ile Val Thr Glu His Val Gln Leu

465

470

475

480

ctg cag gtg atc aag aag acg gag aca gac atg agt ctt cac ccg ctc 1488

Leu Gln Val Ile Lys Lys Thr Glu Thr Asp Met Ser Leu His Pro Leu

485

490

495

ctg cag gag atc tac aag gac ttg tac tag 1518

Leu Gln Glu Ile Tyr Lys Asp Leu Tyr

500

505

<210> 4

<211> 505



<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met	Gly	Glu	Thr	Leu	Gly	Asp	Ser	Pro	Ile	Asp	Pro	Glu	Ser	Asp	Ser
1				5					10					15	
Phe	Thr	Asp	Thr	Leu	Ser	Ala	Asn	Ile	Ser	Gln	Glu	Met	Thr	Met	Val
				20				25						30	
Asp	Thr	Glu	Met	Pro	Phe	Trp	Pro	Thr	Asn	Phe	Gly	Ile	Ser	Ser	Val
				35				40						45	
Asp	Leu	Ser	Val	Met	Glu	Asp	His	Ser	His	Ser	Phe	Asp	Ile	Lys	Pro
				50				55						60	
Phe	Thr	Thr	Val	Asp	Phe	Ser	Ser	Ile	Ser	Thr	Pro	His	Tyr	Glu	Asp
				65				70						75	
Ile	Pro	Phe	Thr	Arg	Thr	Asp	Pro	Val	Val	Ala	Asp	Tyr	Lys	Tyr	Asp
				85				90						95	
Leu	Lys	Leu	Gln	Glu	Tyr	Gln	Ser	Ala	Ile	Lys	Val	Glu	Pro	Ala	Ser
				100				105						110	
Pro	Pro	Tyr	Tyr	Ser	Glu	Lys	Thr	Gln	Leu	Tyr	Asn	Lys	Pro	His	Glu
				115				120						125	
Glu	Pro	Ser	Asn	Ser	Leu	Met	Ala	Ile	Glu	Cys	Arg	Val	Cys	Gly	Asp
				130				135						140	
Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	His	Tyr	Gly	Val	His	Ala	Cys	Glu	Gly	Cys	Lys
				145				150						155	
Gly	Phe	Phe	Arg	Arg	Thr	Ile	Arg	Leu	Lys	Leu	Ile	Tyr	Asp	Arg	Cys
				165				170						175	
Asp	Leu	Asn	Cys	Arg	Ile	His	Lys	Lys	Ser	Arg	Asn	Lys	Cys	Gln	Tyr
				180				185						190	
Cys	Arg	Phe	Gln	Lys	Cys	Leu	Ala	Val	Gly	Met	Ser	His	Asn	Ala	Ile

195	200	205
Arg Phe Gly Arg Met Pro Gln Ala Glu Lys Glu Lys Leu Leu Ala Glu		
210	215	220
Ile Ser Ser Asp Ile Asp Gln Leu Asn Pro Glu Ser Ala Asp Leu Arg		
225	230	235
Ala Leu Ala Lys His Leu Tyr Asp Ser Tyr Ile Lys Ser Phe Pro Leu		
245	250	255
Thr Lys Ala Lys Ala Arg Ala Ile Leu Thr Gly Lys Thr Thr Asp Lys		
260	265	270
Ser Pro Phe Val Ile Tyr Asp Met Asn Ser Leu Met Met Gly Glu Asp		
275	280	285
Lys Ile Lys Phe Lys His Ile Thr Pro Leu Gln Glu Gln Ser Lys Glu		
290	295	300
Val Ala Ile Arg Ile Phe Gln Gly Cys Gln Phe Arg Ser Val Glu Ala		
305	310	315
Val Gln Glu Ile Thr Glu Tyr Ala Lys Ser Ile Pro Gly Phe Val Asn		
325	330	335
Leu Asp Leu Asn Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Tyr Gly Val His Glu		
340	345	350
Ile Ile Tyr Thr Met Leu Ala Ser Leu Met Asn Lys Asp Gly Val Leu		
355	360	365
Ile Ser Glu Gly Gln Gly Phe Met Thr Arg Glu Phe Leu Lys Ser Leu		
370	375	380
Arg Lys Pro Phe Gly Asp Phe Met Glu Pro Lys Phe Glu Phe Ala Val		
385	390	395
Lys Phe Asn Ala Leu Glu Leu Asp Asp Ser Asp Leu Ala Ile Phe Ile		
405	410	415
Ala Val Ile Ile Leu Ser Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Lys		
420	425	430

Pro Ile Glu Asp Ile Gln Asp Asn Leu Leu Gln Ala Leu Glu Leu Gln

435

440

445

Leu Lys Leu Asn His Pro Glu Ser Ser Gln Leu Phe Ala Lys Leu Leu

450

455

460

Gln Lys Met Thr Asp Leu Arg Gln Ile Val Thr Glu His Val Gln Leu

465

470

475

480

Leu Gln Val Ile Lys Lys Thr Glu Thr Asp Met Ser Leu His Pro Leu

485

490

495

Leu Gln Glu Ile Tyr Lys Asp Leu Tyr

500

505

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1300

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt; (1)..(1300)

&lt;400&gt; 5

ccctcagggc ccatagcgca agggcggagg gcacacggac agcggctaga cgccccacag 60  
aaagacaagt ccggggacga cccttctgac cgctcttttt acagccagga cccaagtgtc 120  
ctaccggcct cgccccagtg cctctctctc tcccacagca tactgctgtt ccacggcctc 180  
gaagcgaaga ggtggtgaag ctgagagacc ctatccaggg aaccgcccag cgcgacgcgg 240  
cgtctgaagg tcacgagccc tgccgacagc ccagaccag tccgggctag cccgaggcct 300  
ccctggaggt ggacggtttc agtcacaca tactgggacc ccaggagac actcaccagc 360

atccgagcct gccatgtttc agaggcaggt cgccgccgga ctccgacgcg gccgggaagg 420  
cgacggtgtc ctggaaggac cgatccacgc agacccgaca ctggggcgcg gacgcacgaa 480  
ccaaagcgcg gggaaggagg cgtgaaagaa ggacggacgt taaaagagct tctcgccgct 540  
gattggtcat cagaggagca cttcctttca caggacgtga aacgggggcg gtttggggaa 600  
gtttagagac cattctccgc cgaccaaacc cgtcaaagg attatcagac acgcgggtcg 660  
gacggtccac atcagccggc agcccgggcg ggtcccgggg tgcgagcagc gcacttccgg 720  
tgagctatct cgttttgtat ccctccgccg acgtcaacgg gaaagtagtg cggaccgctc 780  
tctcggtggt ccggggtggt acagccacgt gacaacgcc ggccccgcct tccccctctt 840  
ttgggttacag acgtgagggc tctttggaga cgtaaaccatc tccgagtggc gagggtgggc 900  
ggggctgggc ttgggaaagg gcggggtggc ttgcttgagg tgtggaaaga ccagaagaag 960  
gtgaggtcaa gagagtgcag aatgaggcat tccaatggtg ggtgggccct gacctgagag 1020  
agtggcgcg ggaggggtga aagcgcgcg atcctggaac gccagcgggc gttgcggcct 1080  
atgcgcgagg ggcggggcga ttaggtcata gagcggctcc cagcgttccc tgcggcgtag 1140  
gaggcgggtcc agactataaa agcggctgcc ggaaagcggc cggcacctca ttcatttcta 1200  
ccggtctcta gtagtgcagc ttcggctggt gtcacggtg tccttctcc gctgccgccc 1260  
ccgcaaggct tcgccgtcat cgaggccatt tccagcgact 1300

<210> 6

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 6

agacagttga ctgtatcgga attcatgggt gaaactctgg gagattc

47

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 7

aggagctcct agtacaagtc cttgtagatc

30

<210> 8

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 8

gcgaagaagt ccaaagcggc cgctatgcaa ggcatttctg aaaccg

46

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

ggagagatgg gtggcctgcc atgggtatc

29

<210> 10

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 10

cttctagatc ttattgggaa tatcctgttg gcattggata a

41

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 11

gcacagcagg tgcagcaa

18

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 12

gcaccacat agatgcaagt agac

24

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 13

agggtaccct cagggcccat agcgca

26

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

agctcgagtc gctggaaatg gcctcg

26

【0024】

【図面の簡単な説明】

【図1】

実施例2で行われたルシフェラーゼ活性を示す図を示す

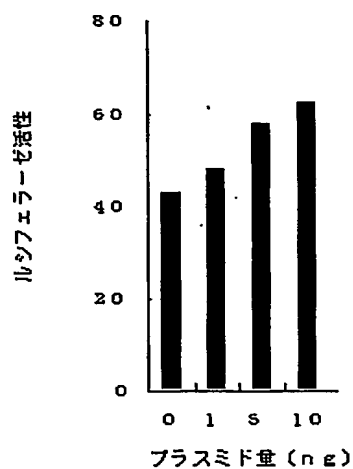
【図2】

実施例5の(3)で行われたルシフェラーゼ活性を示す図を示す

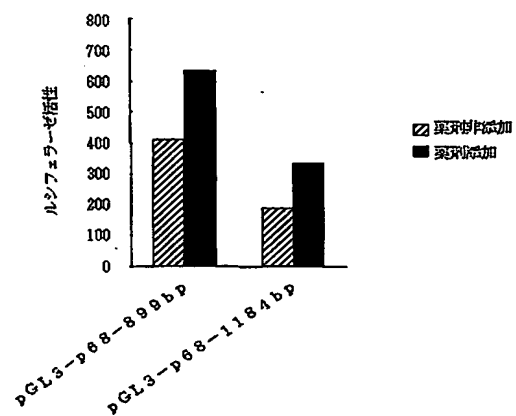


【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

PPAR $\gamma$  の転写誘導活性を促進することによる従来のPPARアゴニストとは異なる新しいタイプのインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

【解決手段】

PPAR $\gamma$  のAF-1領域に結合する蛋白質p68 RNA ヘリケースを同定した。さらに、ヒト脂肪組織中でp68 RNA ヘリケースが発現していることを見出した。次いで、p68 RNA ヘリケースが過剰に発現するとPPAR $\gamma$  の転写誘導活性が促進することを見出した。また、PPAR $\gamma$  リガンドがp68 RNA ヘリケースの発現を誘導することを見出し、PPAR $\gamma$  とp68 RNA ヘリケースとの相互作用を促進する、および／または、p68 RNA ヘリケースの発現を亢進することによりPPAR $\gamma$  の転写誘導活性を促進するインスリン抵抗性を改善する新しい化合物の同定およびスクリーニング方法を完成した。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-193814
受付番号	50200970635
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 7月 3日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成14年 7月 2日

次頁無

特願 2002-193814

出願人履歴情報

識別番号

[000006677]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

1990年 8月10日

新規登録

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

山之内製薬株式会社